

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-325195

(P2003-325195A)

(43) 公開日 平成15年11月18日 (2003. 11. 18)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 P 13/04		C 1 2 P 13/04	4 B 0 6 4
C 0 7 C 229/34		C 0 7 C 229/34	4 H 0 0 6

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2003-130566 (P2003-130566)

(22) 出願日 平成15年5月8日 (2003. 5. 8)

(31) 優先権主張番号 1 0 2 2 0 7 3 9 . 9

(32) 優先日 平成14年5月8日 (2002. 5. 8)

(33) 優先権主張国 ドイツ (D E)

(71) 出願人 501073862

デグサ アクチエンゲゼルシャフト

ドイツ連邦共和国 デュッセルドルフ ベ

ニクゼンブラッツ 1

(72) 発明者 ハラルト グレーガー

ドイツ連邦共和国 ハーナウ アカデミー

シュトラッセ 31

(72) 発明者 ヘルゲ ヴェルナー

ドイツ連邦共和国 ブルッフケーベル イ

ンネラー リング 17

(74) 代理人 100061815

弁理士 矢野 敏雄 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エナンチオマー豊富化したN-保護されていないβ-アミノ酸の酵素的製造方法、β-アミノ酸-n-プロピルエステル及びその使用

(57) 【要約】

【課題】 エナンチオマー豊富化したβ-アミノ酸の製造方法、一般式 (I) のβ-アミノ酸の有利なエステル及びエナンチオマー豊富化したβ-アミノ酸の酵素的製造のための方法におけるその使用。

【解決手段】 加水分解酵素で、N-保護されていないβ-アミノ酸エステルの鏡像異性体混合物を酵素的加水分解するが、但し、相応するメチルエステル又はエチルエステルを使用しない。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 エナンチオマー豊富化したN-保護されていないβ-アミノ酸の製造方法において、加水分解酵素で、N-保護されていないβ-アミノ酸エステルの鏡像異性体混合物を酵素的加水分解するが、但し、相応するメチルエステル又はエチルエステルを使用しないことを特徴とする、エナンチオマー豊富化したN-保護されていないβ-アミノ酸の製造方法。

【請求項2】 β-アミノ酸アルキルエステル又はβ-アミノ酸アリールエステルを使用する、請求項1記載の方法。

【請求項3】 相応するn-プロピルエステル、イソプロピルエステル、n-ブチルエステル、s-ブチルエステル、イソブチルエステル又はt-ブチルエステルを使用する、請求項2記載の方法。

【請求項4】 反応のpH値が4~10、好ましくは6~9及びより好ましくは7~8.5である、請求項1から3までのいずれか1項記載の方法。

【請求項5】 反応の際の温度が-15~+100℃、好ましくは+15~+40℃及びより好ましくは+20~+30℃である、請求項1から4までのいずれか1項記載の方法。

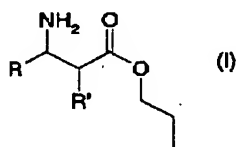
【請求項6】 リパーゼ、好ましくはPseudomonas cepaciaからのリパーゼPSを使用する、請求項1から5までのいずれか1項記載の方法。

【請求項7】 反応を酵素-膜-反応器中で実施する、請求項1から6までのいずれか1項記載の方法。

【請求項8】 加水分解を、水溶性有機溶剤に混ぜることが出来る水性媒体中で実施する、請求項1から7までのいずれか1項記載の方法。

【請求項9】 次の構造(I)

【化1】



【式中、Rは(C₁~C₈)-アルキル、(C₂~C₈)-アルケニル、(C₂~C₈)-アルキニル、(C₃~C₈)-シクロアルキル、(C₆~C₁₀)-アリール、(C₇~C₁₀)-アラルキル、(C₃~C₁₀)-ヘテロアリール、(C₄~C₁₀)-ヘテロアラルキル、((C₁~C₈)-アルキル)₁₋₃、-(C₃~C₈)-シクロアルキル、((C₁~C₈)-アルキル)₁₋₃、-(C₆~C₁₀)-アリール、((C₁~C₈)-アルキル)₁₋₃、-(C₃~C₁₀)-ヘテロアリールを表し、R'はH、(C₁~C₈)-アルキル、(C₂~C₈)-アルケニル、(C₂~C₈)-アルキニル、(C₃~C₈)-シクロアルキル、(C₆~C₁₀)-

C₁₀)-アリール、(C₇~C₁₀)-アラルキル、(C₃~C₁₀)-ヘテロアリール、(C₄~C₁₀)-ヘテロアラルキル、((C₁~C₈)-アルキル)₁₋₃、-(C₃~C₈)-シクロアルキル、((C₁~C₈)-アルキル)₁₋₃、-(C₆~C₁₀)-アリール、((C₁~C₈)-アルキル)₁₋₃、-(C₃~C₁₀)-ヘテロアリールを表す]で示されるβ-アミノ酸-n-プロピルエステル。

【請求項10】 請求項1記載の方法における請求項9記載の化合物の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、エナンチオマー豊富化したβ-アミノ酸の製造方法に関する。同じように、本発明は、β-アミノ酸の有利なエステル及びエナンチオマー豊富化したβ-アミノ酸の酵素的製造方法におけるその使用に関する。

【0002】

【従来の技術】光学活性β-アミノカルボン酸は、天然物、例えばアルカロイド及び抗生物質中に現れ、かつその単離は、とりわけ、医薬の製造の際の必須の中間生成物としてその増大する重要性のために、ますます関心を獲得している(とりわけ次のもの参照: E. Juaristi, H. Lopez-Ruiz, Curr. Med. Chem. 1999, 6, 983-1004)。光学活性β-アミノカルボン酸の遊離形並びにその誘導体は、興味深い薬理作用を示し、かつ修飾ペプチドの合成の際にも使用されうる。

【0003】β-アミノカルボン酸の製造方法として、これまで、ジアステレオマー塩による古典的なラセミ化合物の分割(提案された経路: H. Boesch他, Org. Proc. Res. Developm. 2001, 5, 23-27)及び特にリチウム-フェニルエチルアミドのジアステレオ選択的付加(A. F. Abdel-Magid, J. H. Cohen, C. A. Maryanoff, Curr. Med. Chem. 1999, 6, 955-970)が確立している。後者の方法は、徹底的に探求されたと思われており、かつその場合に起こる多数の欠点にもかかわらず、好ましくは使用される。一方では、化学量論的量のキラルな試薬が必要とされ、このことは、接触不斉法と比較して大きな欠点である。そのうえ、高価でかつさらに危険な助剤、例えばn-ブチルリチウムが、脱プロトン化による化学量論的な試薬の活性化に必要とされる。十分な立体選択性のためには、さらに約-70℃の低い温度での反応の実施が重要であり、このことは、反応器材料への高い要求、付加的な費用及び高いエネルギー消費を意味する。

【0004】生体触媒的過程での光学活性β-アミノカルボン酸の製造は、確かに現在、副次的な役割を演じるのに過ぎないが、しかし特に、生体触媒による反応の経済的利点及び生態学的利点に基づき望ましい。化学量論的量のキラルな試薬の使用が考慮されず、かつその代わ

りに、天然のかつ環境に優しい触媒である酵素の僅かな触媒量が使用される。水性媒体中で効率的に使用されるこれらの生体触媒は、それらの触媒的性質及びそれらの高い有効性に加えて、さらに、多数の合成金属含有触媒とは対照的に、金属含有、特に重金属含有でかつそれゆえ有毒の供給原料の使用が放棄されることができると利点を有する。

【0005】技術水準において、例えばβ-アミノカルボン酸のエナンチオ選択的なN-アシル化のことが既に何度も報告されている。

【0006】例えば、L. T. Kanerva他、Tetrahedron: Asymmetry, 7巻, No. 6, 1707-1716頁, 1996には、有機溶剤中での2, 2, 2-トリフルオロエチルエステルでの多様な脂環式β-アミノカルボン酸のエチルエステルのエナンチオ選択的N-アシル化及び生体触媒としてのCandida antarcticaからのリパーゼ SP 526又はPseudomonas cepaciaからのリパーゼPSが記載されている。

【0007】V. M. Sanchez他は、N-アセチル化β-アミノカルボン酸エステルの製造に関してCandida antarcticaからのリパーゼでの(±)-エチル-3-アミノブチラートの生体触媒によるラセミ化合物の分割(Tetrahedron: Asymmetry, 8巻, No.1, 37-40頁, 1997)を研究している。

【0008】EP-A-8 890 649には、アミダーゼ、プロテアーゼ、エステラーゼ及びリパーゼの群から選択される加水分解酵素の存在で、カルボン酸エステルでのエナンチオ選択的アシル化、及びその後のアミノ酸エステルの未反応鏡像異性体の単離によるラセミ体アミノ酸エステルからの光学活性アミノ酸エステルの製造方法が開示されている。

【0009】WO-A-98/50575は、ラセミ体β-アミノカルボン酸の鏡像異性体を立体選択的にアシル化するための条件下で、ラセミ体β-アミノカルボン酸、アシルドナー及びペニシリンGアシラーゼの接触によるキラルなβ-アミノカルボン酸又はそれに相応するエステルの取得方法に関するものであり、その際、他の鏡像異性体は本質的に反応せず、かつこうしてキラルなβ-アミノカルボン酸が得られる。逆の反応順序も研究されている(V. A. Soloshonok, V. K. Svedas, V. P. Kukhar, A. G. Kirilenko, A. V. Rybakova, V. A. Solodenko, N. A. Fokina, O. V. Kogut, I. Y. Galaev, E. V. Kozlova, I. P. Shishkina, S. V. Galushko, Synlett 1993, 339-341; V. Soloshonok, A. G. Kirilenko, N. A. Fokina, I. P. Shishkina, S. V. Galushko, V. P. Kukhar, V. K. Svedas, E. V. Kozlova, Tetrahedron: Asymmetry 1994, 5, 1119-1126; V. Soloshonok, N. A. Fokina, A. V. Rybakova, I. P. Shishkina, S. V. Galushko, A. E. Sochorinsky, V. P. Kukhar, M. V. Savchenko, V. K. Svedas, Tetrahedron: Asymmetry 1995, 6, 1601-1610; G. Cardillo, A. Tolomelli, C. Tomasini, E

ur. J. Org. Chem. 1999, 155-161)。この方法の場合に不利には、エナンチオ選択的な加水分解後の生成物混合物の困難な後処理である。遊離β-アミノカルボン酸の分離後に、困難に分離されうるフェニル酢酸及びN-フェニルアセチル-β-アミノカルボン酸からなる混合物が得られる。

【0010】エナンチオマー豊富化したカルボン酸の取得のためには、既に長い間、リパーゼとのその反応が公知である。US5518903では、この原理が、しかしながらうまくいったりいかなかったりしながらN-保護されたβ-アミノ酸エステルに転用されてきている。ひとえにラセミ体N-ブトキシカルボニル-β-アミノ酸の相応するベンジルエステルがリパーゼを用いて高度にエナンチオ選択的に分割されることができたのに対して、残りの使用されるメチルエステルもしくはn-ブチルエステルは単に70%の範囲内のee値を提供する。その際、どうやらn-ブチルエステルへの相応するメチルエステルの移行が、製造された酸のee値の悪化と同時に現れるらしいことが確かめられうる。こうして、N-Boc-β-アミノ酸のn-ブチルエステルから出発するエステル加水分解は、Asahi社の酵素リパーゼを用いて、8日後後に収率37%で45% eeの相応する酸のee値をもたらす。AmanoのリパーゼPSを用いて、同じ反応の場合にそれでも7日間かけて41%の収率で61% eeに豊富化した化合物が得られる。それと比較して、相応するメチルエステルは70% eeを提供する。

【0011】Faulconbridge他により最近刊行された結果から、pH 8での芳香族β-アミノ酸エチルエステルのエステル加水分解が、AmanoのリパーゼPSを用いて受け入れられうる収率及び極めて良好な鏡像異性体過剰で行われることが引き出されうる(Tetrahedron Letters 2000, 41, 2679-81)。生成物は、99%までの鏡像異性体純度で得られるが、しかしながら、専ら懸濁液中で実施された合成は、若干の欠点と結びついている。一方では、確かに結晶化がこれらの条件下に選択的であるが、しかしながら反応自体が、比較例1に明らかに示されているように、85.1% eeのより低いee値をまねくことを示していた。全体として、これは一方では望ましくない鏡像異性体の形成に基づく収率損失を意味し、他方ではこれは、ee値が工業的規模で僅かなプロセス変動に応じて、変化した結晶化条件に基づき99% ee未満もしくはそれどころか98% ee未満にも簡単に低下しうることをまねく。>98% ee、特に>99% eeのできるだけ高いee値は、しかし薬剤学的用途のためには必要条件である。さらにまた、限外濾過による良好な酵素分離を保証することができるために、均質な媒体中での実施も望ましいだろう(懸濁液なし!)。最適には、この工程において同様に高いee値が生じるべきであり、このことは、これまでの文献方法

では実現されることができない。

【0012】

【特許文献1】EP-A-8 890 649

【特許文献2】WO-A-98/50575

【特許文献3】US5518903

【非特許文献1】E. Juaristi, H. Lopez-Ruiz, *Curr. Med. Chem.* 1999, 6, 983-1004

【非特許文献2】H. Boesch他, *Org. Proc. Res. Developm.* 2001, 5, 23-27

【非特許文献3】A. F. Abdel-Magid, J. H. Cohen, C. A. Maryanoff, *Curr. Med. Chem.* 1999, 6, 955-970

【非特許文献4】L. T. Kanerva他, *Tetrahedron: Asymmetry*, 7巻, No. 6, 1707-1716頁, 1996

【非特許文献5】*Tetrahedron: Asymmetry*, 8巻, No.1, 37-40頁, 1997

【非特許文献6】V. A. Soloshonok, V. K. Svedas, V. P. Kukhar, A. G. Kirilenko, A. V. Rybakova, V. A. Solodenko, N. A. Fokina, O. V. Kogut, I. Y. Galae v, E. V. Kozlova, I. P. Shishkina, S. V. Galushko, *Synlett* 1993, 339-341

【非特許文献7】V. Soloshonok, A. G. Kirilenko, N. A. Fokina, I. P. Shishkina, S. V. Galushko, V. P. Kukhar, V. K. Svedas, E. V. Kozlova, *Tetrahedron: Asymmetry* 1994, 5, 1119-1126

【非特許文献8】V. Soloshonok, N. A. Fokina, A. V. Rybakova, I. P. Shishkina, S. V. Galushko, A. E. S ochorinsky, V. P. Kukhar, M. V. Savchenko, V. K. S vedas, *Tetrahedron: Asymmetry* 1995, 6, 1601-1610

【非特許文献9】G. Cardillo, A. Tolomelli, C. Tomasini, *Eur. J. Org. Chem.* 1999, 155-161

【非特許文献10】Faulconbridge他, *Tetrahedron Letters* 2000, 41, 2679-81

【非特許文献11】*Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Ed.: K. Drauz, H. Waldmann, VCH, 1995, 165 頁

【非特許文献12】Sharma B. P.; Bailey L. F.及びMessing R. A. (1982), *Immobilisierte Biomaterialien-Techniken und Anwendungen*, *Angew. Chem.* 94, 836-85 2)

【非特許文献13】Paradkar; V. M.; Dordick, J. S. (1994), *Aqueous-Like Activity of α -Chymotrypsin Dissolved in Nearly Anhydrous Organic Solvents*, *J. Am. Chem. Soc.* 116, 5009-5010

【非特許文献14】Mori, T.; Okahata, Y. (1997), *A variety of lipi-coated glycosidehydrolases as effective glycosyl transfer catalysts in homogeneous organic solvents*, *Tetrahedron Lett.* 38, 1971-1974

【非特許文献15】Otamiri, M.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B. (1992), *Complex formation between chymotrypsin and ethyl cellulose as a means to solub* 50

ilize the enzyme in active form in toluene, *Biocatalysis* 6, 291-305

【非特許文献16】Kamiya, N.; Okazaki, S. -Y.; Got o, M. (1997), *Surfactant-horseradish peroxidase complex catalytically active in anhydrous benzene*, *Biotechnol. Tech.* 11, 375-378

【非特許文献17】E. Katchalski-Katzir, D. M. Kraemer, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2000, 10, 157

【非特許文献18】Petty, K. J. (1996), *Metal-chelate affinity chromatography In: Ausubel, F. M.他 ed s. Current Protocols in Molecular Biology*, 2巻, New York: John Wiley and Sons

【非特許文献19】St. Clair, N.; Wang, Y. -F.; Margolin, A. L. (2000), *Cofactor-bound cross-linked enzyme crystals (CLEC) of alcohol dehydrogenase*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 39, 380-383

【非特許文献20】Bormarius, A. S.; Drauz, K.; Groeger, U.; Wandrey, C.; *Membrane Bioreactors for the Production of Enantiomerically Pure α -Amino Acid s*, in: *Chirality in Industry* (Hrsg.: Collins, A. N.; Sheldrake, G. N.; Crosby, J.) 1992, John Wiley & Sons, 371-397頁

【0013】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、故に、 β -アミノ酸を酵素的に製造するための別の方法の記載であった。特に、本方法は、経済的並びに生態学的視点のもとに有利には工業的規模で使用可能であるべきであり、すなわち環境適合性、労災防止及びプロセスの頑丈さ並びに空/時一収量及び選択率に関して特に傑出すべきである。

【0014】

【課題を解決するための手段】より詳細に記載されないが、しかしながら技術水準から当然と思われるように従うこれらの及び別の課題は、対象の請求項1の特徴を有する方法により解決される。従属請求項2～8は、本発明の好ましい実施態様に基ついている。請求項9は、 β -アミノ酸の新規のエステルに向けられており、かつ対象の方法における有利なその使用は、請求項10に保護されている。

【0015】加水分解酵素でのN-保護されていない β -アミノ酸エステルの鏡像異性体混合物の酵素的加水分解によるエナンチオマー豊富化したN-保護されていない β -アミノ酸の製造方法が実施されるが、但し、相応するメチルエステル又はエチルエステルが使用されないことにより、極めて意外にも、このためにしかしそれに劣らず有利な方法でなされた課題の解決に成功する。これまで、考慮される反応には、単にN-保護されていない β -アミノ酸のメチルエステル又はエチルエステルが使用されていたが、これらのエステルはしかしながら上記で既に挙げられた欠点を必然的に伴う。どうやら、例

例えば(C₃~C₆)-アルキル基を有する、空間をより占めるエステル基が酵素的加水分解のために採用される場合には、空時収量並びに選択率から判断されたより良好な結果をもたらす。これは、一方では上記で論じたUS 5518903に関して意外であるとみなされうるものであり、他方では、この傾向は予期されていない、それというのも、より迅速な反応の場合にエナンチオ分別の確率は一般に減少するからである。これらの論理的関連には、より高い反応温度での—その際反応がこのためにより迅速に進行する—一般的により低いエナンチオ選択性が考慮される場合に、例示的に明示されうる。

【0016】原則的には、当業者は相応するエステル基の選択において自由である。その選択の際に経済的かつ反応工学的視点に沿う。エステルの形成のために好都合なアルコールは、特に反応混合物から簡単に除去されることができるようなものである。これらは、アルコール、例えばアルキルアルコール又はアリールアルコール、場合により低沸点フェノール又はベンジルアルコールである。これらのアルコールで入手可能なβ-アミノ酸アルキルエステル又はβ-アミノ酸アリールエステルは、故に好ましくは加水分解において使用される。極めて特に好ましくは、β-アミノ酸の相応するn-プロピルエステル、イソプロピルエステル、n-ブチルエステル、s-ブチルエステル、イソブチルエステル又はt-ブチルエステルの使用である。

【0017】反応パラメーターの選択は、当業者に同様に自由に任される。これは個々の場合についてルーチン実験に基づいて別個に算出される。いずれにせよ、本対象の酵素的方法には、4~10、好ましくは6~9のpH値範囲が適しており、かつより好ましくは7~8.5である。pH 8周辺で、Amano社のリパーゼPSが特に適していることがわかった。

【0018】温度に関して、原則としてpH値についてと同じ必要条件が存在する。ここでも、どの酵素がどの温度で最も最適に操作されるかに応じて、できるだけ最適な温度が個々の場合について算出されうる。好熱生物からの酵素については、100℃までの高い温度が可能である。他方で他のものは、<0℃~-15℃ではじめて最適に、場合によりアイスマトリックス中で操作する。好ましくは、反応の間に調節された温度は15~40℃及びより好ましくは20~30℃の範囲内であるべきである。

【0019】使用するべき酵素の選択は、当業者の務めである。Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, Ed.: K. Drauz, H. Waldmann, VCH, 1995, 165頁及びそこで引用された文献から、多くの適している酵素が選択可能である。好ましくは、エステル加水分解にはリパーゼが選ばれ、より好ましくは、Pseudomonas cepaciaからのAmanoのリパーゼPSが使用される。

【0020】適用については、考慮されるポリペプチド

は、遊離形で、均質に精製された化合物又は組換え型として製造された酵素として使用されてよい。さらに、ポリペプチドは、無傷の寄生生物(Gastorganismus)の成分としても、又は宿主生物(Wirtsorganismus)の溶解されかつ任意に高度に精製された細胞塊と一緒に使用されてよい。

【0021】同様に固定化された形での酵素の使用が可能である(Sharma B. P.; Bailey L.F.及びMessing R. A. (1982), Immobilisierte Biomaterialien-Techniken und Anwendungen, Angew. Chem. 94, 836-852)。有利には固定化は凍結乾燥により行われる(Paradkar, V. M.; Dordick, J. S. (1994), Aqueous-Like Activity of α-Chymotrypsin Dissolved in Nearly Anhydrous Organic Solvents, J. Am. Chem. Soc. 116, 5009-5010; Mori, T.; Okahata, Y. (1997), A variety of lipi-coated glycoside hydrolases as effective glycosyl transfer catalysts in homogeneous organic solvents, Tetrahedron Lett. 38, 1971-1974; Otamiri, M.; Adlercreutz, P.; Matthiasson, B. (1992), Complex formation between chymotrypsin and ethyl cellulose as a means to solubilize the enzyme in active form in toluene, Biocatalysis 6, 291-305)。極めて特に好ましくは、表面活性物質、例えばAerosol OT又はポリビニルピロリドン又はポリエチレングリコール(PEG)又はBrij 52(ジエチレングリコール-モノ-セチルエーテル)の存在での凍結乾燥である(Kamiya, N.; Okazaki, S.; Y.; Goto, M. (1997), Surfactant-horseradish peroxidase complex catalytically active in anhydrous benzene, Biotechnol. Tech. 11, 375-378)。

【0022】極めて好ましくは、Eupergit^(R)、特にEupergit C^(R)及びEupergit 250L^(R)(Roehm)上での固定化である(概観として、次のもの参照: E. Katchalski-Katzir, D. M. Kraemer, J. Mol. Catal. B: Enzym. 2000, 10, 157)。同様に好ましくは、His-タグ(ヘキサ-ヒスチジン)を付けることにより修飾されたポリペプチドとの組合せでのNi-NTA上での固定化である(Petty, K. J. (1996), Metal-chelate affinity chromatography In: Ausubel, F. M. 他 eds. Current Protocols in Molecular Biology, 2巻, New York: John Wiley and Sons)。

【0023】CLECsとしての使用は、同様に考えられる(St. Clair, N.; Wang, Y.-F.; Margolin, A. L. (2000), Cofactor-bound cross-linked enzyme crystals (CLEC) of alcohol dehydrogenase, Angew. Chem. Int. Ed. 39, 380-383)。これらの措置により、有機溶剤により不安定になるポリペプチドから、水性溶剤及び有機溶剤の混合物中もしくは完全に有機物(Organik)中で操作されることができるようなのを生じさせることに成功しうる。

【0024】本対象の反応は、それぞれこのために準備

された反応容器中で実施されることができる。これらは、詳細には通常のバッチ反応器、ループ反応器又は酵素-膜-反応器である(Bommarius, A. S.; Drauz, K.; Groeger, U.; Wandrey, C.; Membrane Bioreactors for the Production of Enantiomerically Pure α -AminoAcids, in: Chirality in Industry (Hrsq.: Collins, A. N.; Sheldrake, G. N.; Crosby, J.) 1992, John Wiley & Sons, 371-397頁)。

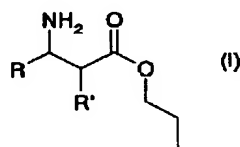
【0025】本発明による反応の際に使用すべきエステルは、時折、水性反応媒体中への劣悪な溶解度を示す。これらの場合に、使用される酵素の溶剤耐性に応じて、均質な反応相を得るために水溶性有機溶剤を反応混合物に添加することは、有利でありうる。そのような水溶性有機溶剤として、とりわけ詳細には次のものが当てはまる：アセトン、DMF、エタノール、メタノール。しかし反応は、より高い基質濃度でも懸濁液の形成下に成功する。

【0026】場合により水に不溶性の担持材料もしくは随伴物質又は安定剤上に吸着されて存在する酵素の使用の場合には、不溶性の担体もしくは随伴物質又は安定剤を、反応における酵素の使用前に、酵素及び担体の分離が単純に可能である限り、使用される酵素の不溶性の担持材料でもたらさるる生成物が汚染されないように、分離することが有利であることが判明している。例えば、有利には使用すべきAmano社のリパーゼPSはシリカ担体上に吸着されている。ここでは、故に、反応系からケイ酸を除去するために、反応媒体への反応体の添加前に酵素水溶液のろ過が行われるべきである。酵素の活性又は加工性は、この手順に負の影響を及ぼさない。

【0027】本発明の対象は、同様に、次の構造(I)

【0028】

【化2】



【0029】【式中、Rは(C₁~C₈)-アルキル、(C₂~C₈)-アルケニル、(C₂~C₈)-アルキニル、(C₃~C₈)-シクロアルキル、(C₆~C₁₀)-アリール、(C₇~C₁₀)-アラールキル、(C₃~C₁₀)-ヘテロアリール、(C₄~C₁₀)-ヘテロアラールキル、((C₁~C₈)-アルキル)₁₋₃、(C₃~C₈)-シクロアルキル、((C₁~C₈)-アルキル)₁₋₃、(C₆~C₁₀)-アリール、((C₁~C₈)-アルキル)₁₋₃、(C₃~C₁₀)-ヘテロアリールを表し、R'はH、(C₁~C₈)-アルキル、(C₂~C₈)-アルケニル、(C₂~C₈)-アルキニル、(C₃~C₈)-シクロアルキル

ル、(C₆~C₁₀)-アリール、(C₇~C₁₀)-アラールキル、(C₃~C₁₀)-ヘテロアリール、(C₄~C₁₀)-ヘテロアラールキル、((C₁~C₈)-アルキル)₁₋₃、(C₃~C₈)-シクロアルキル、((C₁~C₈)-アルキル)₁₋₃、(C₆~C₁₀)-アリール、((C₁~C₈)-アルキル)₁₋₃、(C₃~C₁₀)-ヘテロアリールを表す]で示される β -アミノ酸-n-プロピルエステルである。極めて特に有利には、Rが芳香族基、特にフェニル、チエニル、フリル、ビリジル、並びに特に置換基として(C₁~C₈)-アルキル又は(C₁~C₈)-アルコキシを有する、芳香族環上で1回又は複数回置換されたその誘導体を表し、かつR'がHを表す化合物である。例示的に、3-アミノ-3-フェニルプロピオン酸-n-プロピルエステルがこれらの化合物タイプの特に興味深い代表例として挙げられうる。

【0030】本発明の対象は、同様に本発明による方法における前記の化合物の使用である。

【0031】“N-保護されていない”は、本発明の範囲内で、酸の β -窒素原子が反応条件下に安定なN-保護基によりブロックされていないという事実であると理解される。そのようなものとして、特に普通の保護基、例えばZ-、Boc-、Fmoc-、Eoc-、Moc-、アセチル-等が認識されうる。

【0032】(C₁~C₈)-アルキルとみなされうるのは、全ての結合異性体と一緒に、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、s-ブチル、t-ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル又はオクチルである。これらは、(C₁~C₈)-アルコキシ、(C₁~C₈)-ハロゲンアルキル、OH、ハロゲン、NH₂、NO₂、SH、S-(C₁~C₈)-アルキルで1回又は複数回置換されていてよい。(C₃~C₈)-アルキルは相応して認識されうる。

【0033】(C₂~C₈)-アルケニルとして、メチルを例外として、少なくとも1つの二重結合を有する前記で表されたような(C₁~C₈)-アルキル-基であると理解すべきである。

【0034】(C₂~C₈)-アルキニルは、メチルを例外として、少なくとも1つの三重結合を有する前記で表されたような(C₁~C₈)-アルキル-基であると理解すべきである。

【0035】(C₁~C₈)-アシルは、-C=O官能基を介して分子に結合した(C₁~C₈)-アルキル-基であると理解される。

【0036】(C₃~C₈)-シクロアルキルは、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルもしくはシクロヘプチル基等であると理解される。これらは、1つ又はそれ以上のハロゲン及び/又はN-、O-、P-、S-原子含有の基で置換されていてよく及び/又は環中にN-、O-、P-、S-原子含有

の基、例えば1-, 2-, 3-, 4-ピペリジル、1-, 2-, 3-ピロリジニル、2-, 3-テトラヒドロフリル、2-, 3-, 4-モルホリニルを有してよい。これは、(C₁ ~ C₈) - アルコキシ、(C₁ ~ C₈) - ハロゲンアルキル、OH、ハロゲン、NH₂、NO₂、SH、S-(C₁ ~ C₈) - アルキル、(C₁ ~ C₈) - アシル、(C₁ ~ C₈) - アルキルで1回又は複数回置換されていてよい。

【0037】(C₆ ~ C₁₀) - アリール基は、炭素原子6 ~ 18個を有する芳香族基であると理解される。特にこれには化合物、例えばフェニル基、ナフチル基、アントリル基、フェナントリル基、ピフェニル基が含まれる。これは、(C₁ ~ C₈) - アルコキシ、(C₁ ~ C₈) - ハロゲンアルキル、OH、ハロゲン、NH₂、NO₂、SH、S-(C₁ ~ C₈) - アルキル、(C₁ ~ C₈) - アシル、(C₁ ~ C₈) - アルキルで1回又は複数回置換されていてよい。

【0038】(C₇ ~ C₁₀) - アラルキル基は、(C₁ ~ C₈) - アルキル基を介して分子に結合した(C₆ ~ C₁₀) - アリール基である。

【0039】(C₁ ~ C₈) - アルコキシは、酸素原子を介して考慮される分子に結合した(C₁ ~ C₈) - アルキル基である。

【0040】(C₁ ~ C₈) - アルコキシカルボニルは、-OC(O)官能基を介して考慮される分子に結合した(C₁ ~ C₈) - アルキル基である。これは、他のオキシカルボニル基と同義にみなされる。

【0041】(C₁ ~ C₈) - ハロゲンアルキルは、1つ又はそれ以上のハロゲン原子で置換された(C₁ ~ C₈) - アルキル基である。

【0042】(C₉ ~ C₁₀) - ヘテロアリール基は、本発明の範囲内で、ヘテロ原子、例えば窒素、酸素又は硫黄を環中に有し、炭素原子3 ~ 18個からなる5、6又は7員の芳香族環系を呼ぶ。そのようなヘテロ芳香族化合物とみなされるのは、特に基、例えば1-, 2-, 3-フリル、例えば1-, 2-, 3-ピロリル、1-, 2-, 3-チエニル、2-, 3-, 4-ピリジル、2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-インドリル、3-, 4-, 5-ピラゾリル、2-, 4-, 5-イミダゾリル、アクリジニル、キノリニル、フェナントリジニル、2-, 4-, 5-, 6-ピリミジニルである。これは、(C₁ ~ C₈) - アルコキシ、(C₁ ~ C₈) - ハロゲンアルキル、OH、ハロゲン、NH₂、NO₂、SH、S-(C₁ ~ C₈) - アルキル、(C₁ ~ C₈) - アシル、(C₁ ~ C₈) - アルキルで1回又は複数回置換されていてよい。

【0043】(C₄ ~ C₁₀) - ヘテロアラルキルは、(C₇ ~ C₁₀) - アラルキル基に相応するヘテロ芳香族系であると理解される。

【0044】ハロゲンとして、フッ素、塩素、臭素及び

ヨウ素が当てはまる。

【0045】用語のエナンチオマー豊富化した、は、本発明の範囲内で、>50%かつ<100%の範囲内のその光学対掌体との混合物中の鏡像異性体の含分であると理解される。

【0046】示された構造は、全ての可能なジアステレオマー及び鏡像異性体及び可能であるその混合物に基づいている。

【0047】記載された文献箇所は、本発明の開示と一緒に含まれるものとみなされる。

【0048】

【実施例】実験例：

例1 (=比較例)：ラセミ化合物rac-3-アミノ-3-フェニルプロピオン酸エチルエステル9. 2mmol

(1. 79g)を水50mL中に取り、かつ自動pH-スタートを用いて1Mカセイソーダ液(Merck社から購入)の添加により溶液をpH 8. 2のpH値に調節する。エステルを完全に溶解させるために、さらにアセトン3mLを溶解させるために添加する。20°Cの反応温度に達した際に、反応を開始するために、AmanoリパーゼPS 200mg (Pseudomonas cepacia; Amano Enzymes, Inc.社から購入)を添加する。3及び6時間の反応時間後に形成された(S)-3-アミノ-3-フェニルプロピオン酸の転換速度並びに6時間後にエナンチオ選択性が測定される。その際、3時間後に18. 5%もしくは6時間後に37. 8%の転換率及び85. 1% eeのエナンチオ選択性(6時間後)が算出される。転換率測定及びエナンチオ選択性測定をHPLCにより行った。

【0049】例2：ラセミ化合物rac-3-アミノ-3-フェニルプロピオン酸-n-ブチルエステル9. 2mmol (1. 91g)を水50mL中に取り、かつ自動pH-スタートを用いて1Mカセイソーダ液(Merck社から購入)の添加により、溶液をpH 8. 2のpH値に調節する。エステルを完全に溶解させるために、さらにアセトン3mLを溶解させるために添加する。20°Cの反応温度に達した際に、反応を開始するために、AmanoリパーゼPS 200mg (Pseudomonas cepacia; Amano Enzymes, Inc.社から購入)を添加する。1時間の反応時間後に、形成された(S)-3-アミノ-3-フェニルプロピオン酸の転換速度並びに3時間後にエナンチオ選択性が測定される。その際、1時間後に48. 7%の転換率及び96. 4% eeのエナンチオ選択性(3時間後)が算出される。転換率測定及びエナンチオ選択性測定をHPLCにより行った。

【0050】例3：ラセミ化合物rac-3-アミノ-3-フェニルプロピオン酸-n-ブチルエステル8. 63mmol (1. 91g)を水50mL中に取り、かつ自動pH-スタートを用いて1Mカセイソーダ液(Merck社から購入)の添加により、溶液をpH 8. 2のpH値に調節する。エステルを完全に溶解させるために、さらにアセ

トン3 mLを溶解させるために添加する。20℃の反応温度に達した際に、反応を開始するために、AmanoリパーゼPS 200 mg (Pseudomonas cepacia; Amano Enzymes, Inc.社から購入)を添加する。3時間の反応時間後に、形成された(S)-3-アミノ-3-フェニルプロピオン酸の転換速度並びにエナンチオ選択性を測定する。その際、45.2%の転換率及び96.8% eeのエナンチオ選択性が算出される。転換率測定及びエナンチオ選択性測定をHPLCにより行った。

【0051】例4：水81 mLを装入し、かつこれにAmanoリパーゼPS 1.45 g (Pseudomonas cepacia; Amano Enzymes, Inc.社より購入)を添加する。引き続いて溶けない固体を濾別する。ろ液として生じる酵素水溶液を、有機溶剤成分としてメチル-tert-ブチルエーテル81 mL (MTBE)と混合する。生じた二相系を、自動pH-スタットを用いて1 Mカセイソーダ液(Merck社より購入)の添加によりpH 8.2に調節する。20℃の*

*温度に達した際に、次いでラセミ化合物rac-3-アミノ-3-フェニルプロピオン酸-n-プロピルエステル188.2 mmol (39.0 g)を添加し、かつ反応を開始する。反応時間は15時間であり、その際、所望の生成物(S)-3-アミノ-3-フェニルプロピオン酸からなる白色沈殿物が生じる。15時間の反応時間後に、アセトン160 mLを、沈殿を完全にするために添加し、約45分間後攪拌し、かつ固体を濾別する。固体を、少しのアセトンで複数回洗浄し、かつ引き続いて真空中で乾燥させる。41.6%の収率に相当する所望の(S)-3-アミノ-3-フェニルプロピオン酸12.91 gが得られる。生成物についてのエナンチオ選択性は99.6% eeである。エナンチオ選択性測定をHPLCにより行った。化学的純度については98.8%が算出された(滴定により算出)。生成物の構造を、付加的にNMR分光法により確認した。

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B064 AE03 CA21 CB02 CB03 CD27
CE03 DA01
4H006 AA01 AA03 AB80 BJ50 BT12
BU30